

嗜热四膜虫的着丝粒蛋白检查

吴传芬 代嘉陵¹ 杨新林 李靖炎* 王永潮

(北京师范大学生物系 100875)

(* 中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化开放研究实验室 昆明 650223)

摘要 目前国际上的着丝粒蛋白研究工作几乎全是以酵母和高等生物为材料进行的。为了从起源与进化的角度考察着丝粒蛋白, 我们以人喉癌培养细胞 HepII 作为对照材料, 以两种 ACA 血清和 CENP-B 单抗、多抗以及 CHO 动粒蛋白单抗为探针, 用间接免疫荧光和免疫印迹技术对嗜热四膜虫 (*Tetrahymena thermophila*) 作检查。免疫荧光结果表明, HepII 细胞的着丝粒抗原在间期核中呈点状分布; 与 HepII 细胞的不同, 嗜热四膜虫的着丝粒抗原在间期核中的分布呈不规则的斑块状。免疫印迹结果表明, 作为单细胞生物的纤毛虫虽然在进化上距离哺乳动物和人甚远, 但却已具备了与哺乳动物和人的相似的着丝粒/动粒点抗原蛋白。这说明着丝粒和动粒的蛋白组分可能是发生得很早的, 而且是相当保守的。

关键词 四膜虫, 着丝粒蛋白, ACA 血清

为要更深刻地认识和理解典型真核细胞着丝粒的结构与功能, 就需要从它的起源与进化的角度来进行考察。对此国际上迄今尚无专门的系统研究, 我们对着丝粒和动粒的一些蛋白组分的起源与进化开始进行探索。

目前国际上的着丝粒蛋白研究工作几乎全是以酵母和高等生物为材料进行的。由于酵母属于真菌, 从分子进化的研究结果来看实际上已经相当高等, 而且国际上对它们的着丝粒也已做了大量的工作, 因此我们用比酵母低等得多的原生动物为研究材料, 而以人的喉癌培养细胞 HepII 作为对照。

在原生动物中, 纤毛虫是最高等的类群。其细胞内有十分复杂和特化的细胞器; 其细胞核分化成大核和小核两种形式。大核与小核在体积上悬殊很大; 在功能上大核为营养核, 小核为生殖核。我们以嗜热四膜虫作为代表材料。这里我们用两种 ACA 血清和 CENP-B 单抗、多抗以及 CHO 动粒蛋白单抗对嗜热四膜虫作检查。

1 材料与方法

1.1 材料

HepII 细胞用 1640 培养基培养, 加入谷氨酰胺至 0.03%、胎牛血清至 10%、青霉素和链霉素分别至 100 u/ml。在 37℃ CO₂ 培养箱内用培养瓶作单层贴壁培养。

吴传芬现在地址: 美国 Texas 大学, M D Anderson Cancer Center, 分子遗传学系, Houston, Texas 77030

本文 1995 年 7 月 29 日收到, 同年 11 月 28 日修回

嗜热四膜虫 (*Tetrahymena thermophila*) SB225 虫种由北京大学生物系陈阅增教授实验室惠赠。在 30℃ 恒温条件下作悬浮培养。培养基: 2% 蛋白胨, 1% 酵母粉。

1.2 方法

1.2.1 间接免疫荧光染色 与吴传芬等 (1996) 相同。

1.2.2 免疫印迹 与吴传芬等 (1996) 相同。

电泳及印迹用我们改进后的方法 (吴传芬等, 1996)。但是我们在工作中发现, 在制 SDS-PAGE 蛋白样品时必须先脱去纤毛, 否则会强烈干扰蛋白的电泳分离。

脱纤毛处理: 收集细胞并悬浮于 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH6.8 溶液中, 加入 20 ml 50 mM NaAC、2 ml 100 mM EDTA、0.6 ml 1 M 氯化钙。缓慢搅拌均匀, 冰浴放置 5 min。离心收集细胞沉淀, 用 Tris-HCl pH6.8 buffer 洗涤即成。

一抗 与吴传芬等 (1996) 相同。

二抗 与吴传芬等 (1996) 相同。

2 结果与讨论

嗜热四膜虫 (*Tetrahymena thermophila*) 按照 Kudo 的分类隶属原生动物门, 纤毛虫纲 (Class Ciliata), 全毛目 (Order Holotricha), 前口虫科 (Family Frontoniidae), 四膜虫属, 梨形四膜虫复合种 (*Tetrahymena pyriformis* complex) 中的嗜热四膜虫种。嗜热四膜虫的细胞呈梨形, 长约 50 μm , 宽约 30 μm ; 口器位于细胞近前端, 口器内有 3 个小膜, 口边缘有 1 个波动膜 (这就是四膜虫的“四膜”)。大核近乎呈圆形, 直径约 10 μm , 位于细胞中央, 小核位于大核附近, 直径约 1.5—2 μm 。

2.1 间接免疫荧光染色

经过免疫荧光染色后, 嗜热四膜虫的大核和小核都染上了色, 但不能分辨出细小的前着丝粒小点, 而只能看到一些不规则的点状物, 似由几个小点聚集成。由于荧光很弱, 未能照相。

2.2 免疫印迹

2.2.1 ACA 血清印迹结果 用 ACA 血清作免疫印迹检查, 嗜热四膜虫的全细胞蛋白样品中有许多蛋白带被血清中的抗体所识别 (图 1c)。在分子量约 14—35 kD 区段和 80 kD 以上区段的反应带与 HepII 细胞的是一致的; 在 35—80 kD 区段, 则比 HepII 的带要少一些 (图 2)。

嗜热四膜虫的 SH 血清印迹结果与 HepII 细胞的 SH 血清印迹的也基本相似, 而且在 ACA 血清反应中没有显示出来的有些带在 SH 血清的反应中显示出来了 (图 2)。可以认为, 嗜热四膜虫含有的 ACA 血清抗原蛋白与 HepII 的是相似的。

2.2.2 多抗 ra-ACA-2 的印迹结果 嗜热四膜虫对多抗 ra-ACA-2 的反应与 HepII 的是一致的 (图 3)。它含有与 HepII 的 CENP-B 极相似的蛋白。

2.2.3 单抗 mACA-2 的印迹结果 用单抗 mACA-2 作印迹检查后得到 3 条阳性反应蛋白带, 比 HepII 的多 1 条分子量更高的弱反应带 (图 4)。着色深的带大约为 80 kD, 其余两条带的分子量难于准确估计, 但都比较高。在 ra-ACA-2 多抗的印迹结果中没有发现这两条带, 因而它们极有可能是具有与 CENP-B 氨基酸相似结构的非 CENP-B 蛋白。四膜虫对 CENP-B 抗体的反应与 HepII 的没有多大差异。

2.2.4 mAb37A5 的印迹结果 嗜热四膜虫对 mAb37A5 的反应只有 1 条阳性带, 与 HepII 的有所不同, 而且分子量也比 HepII 的两条都低些 (图 5)。其原因尚不清楚。

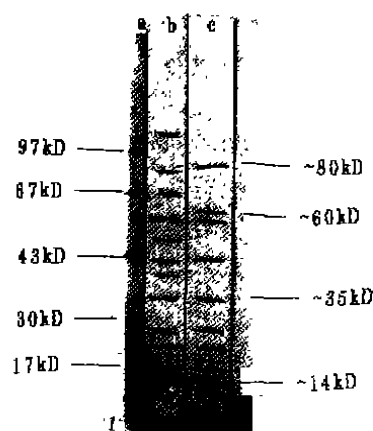


图 1 ACA 血清的免疫印迹结果

Fig.1 The result of the immuno-blotting detection by ACA anti-serum

a. 标准分子量蛋白(standard proteins for identifying molecular weights); b. HepII; c. 嗜热四膜虫(*T. thermophila*)

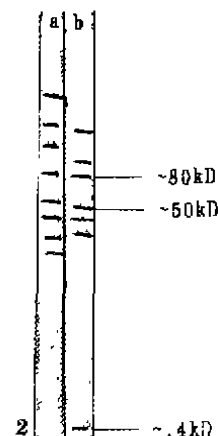


图 2 SH 血清的印迹结果

Fig.2 The result of the immuno-blotting detection by SH anti-serum

a. 嗜热四膜虫(*T. thermophila*); b. HepII.

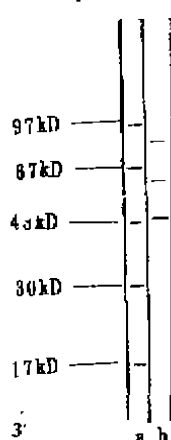


图 3 CENP-B 多抗 ra-ACA-2 的印迹结果

Fig.3 The result of the immuno-blotting detection by polyclonal antibody, ra-ACA-2, against human CENP-B

a. 标准分子量蛋白(standard proteins for identifying molecular weights); b. 嗜热四膜虫(*T. thermophila*)

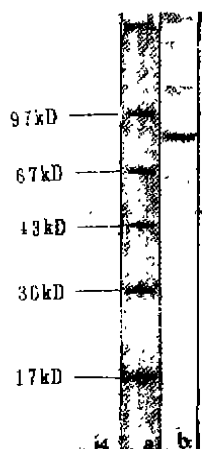


图 4 CENP-B 单抗 mACA-2 的印迹结果

Fig.4 The result of the immuno-blotting detection by monoclonal antibody, mACA-2, against human CENP-B

a. 标准分子量蛋白(standard proteins for identifying molecular weights); b. 嗜热四膜虫(*T. thermophila*)

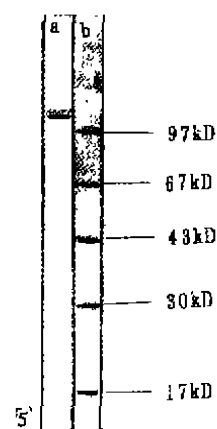


图 5 mAb37A5 单抗的印迹结果

Fig.5 The result of the immuno-blotting detection by monoclonal antibody, mAb37A5, against the kineto chore protein of CHO cell

a. 嗜热四膜虫(*T. thermophila*); b. 标准分子量蛋白(standard proteins for identifying molecular weights).

迄今所知的关于纤毛虫的着丝粒蛋白工作有两个,一个是美国 Cox 等人用 Cen-2 ACA 血清对梨形四膜虫所作的检查,发现其着丝粒含有 14 kD 和 23 kD 两种蛋白 (Cox 等, 1985, Cox 等, 1983)。另一个是王永潮教授等用自己筛选的 ACA 血清对草履虫所作的荧光染色,发现其小核是阳性反应。这与我们得到的部分结果是一致的。

从上面的实验结果看出,作为单细胞生物的纤毛虫虽然在进化上距离哺乳动物和人甚远,但却已具备了与哺乳动物和人的相似的着丝粒/动粒点抗原蛋白。这说明着丝粒和动粒的蛋白组分可能在进化上发生得很早,而且相当保守。现有的文献资料表明,一些纤毛虫小核的中期染色体已有着丝粒和动粒的形态分化。因此,上述的结果并不难理解。

参 考 文 献

- 吴传芬, 李靖炎, 代嘉陵等, 1996 涡鞭毛虫 (甲藻) 着丝粒/动粒蛋白的检查. 动物学研究, 17(3): 307—313.
 Cox J V, Olmsted J B. 1985. Molecular Biology of the Cytoskeleton, Cold Spring Harbour Laboratory Press 71—77.
 Cox J V, Schenk E A, Olmsted J B. 1983 Human antacentromere antibodies: distribution, characterization of antigens, and efficient on microtubule organization. Cell, 35: 331—339.

THE DETECTION OF CENTROMERE PROTEINS IN *Tetrahymena thermophila*

Wu Chuanfen¹⁾ Dai Jialing Yang Xinlin²⁾ Li Jingyan²⁾ Wang Yongchao¹⁾

(¹⁾Dept. of Biology, Beijing Normal University, Beijing 100875)

(²Laboratory of Cellular and Molecular Evolution, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy Sciences, Kunming Yunnan 650223)

Abstract

Up to now, the studies on the centromere proteins are almost carried out in yeast and higher organisms in the world. In this paper we report our studies on centromere proteins in one kind of ciliates, which is much lower than yeast in the evolutionary position mainly with indirect immunofluorescent microscopy and western immunoblotting techniques using two ACA sera, ra-ACA-2, mACA-2, and mAb37A5 as probes. The control material in the study is human HepII cell.

With immunofluorescent stain with Chinese ACA antiserum, in the interphase nucleus of HepII cells only very minute spots—precentromere could be observed. This means that the ACA antiserum can actually and specifically recognize the protein components of centromere/kinetochore. When *Tetrahymena*, was stained with the same technique, there were only patched within nuclei composed of minute fluorescent spots; no precentromere could be distinguished, although all the nuclei gave positive reaction.

After immunoblotted with Chinese ACA serum and SH serum, the positive band-pattern

(from 14 kD to 140 kD) of *Tetrahymena* was highly similar to the band-pattern of human HepII cells. The blotting results with mACA-2 antibody showed that HepII cells gave two bands (80 kD, stained deely and 120 kD, stained slightly), *Tetrahymena*, gave three positive bands (80 kD, 120 kD, and 150 kD). The blotting results with ra-ACA-2 antiserum showed that Hep II and *Tetrahymena* all gave 50 kD, 60 kD and 80 kD bands. In the immunoblotting with monoclonal antibody mAb37A5, HepII cells gave two bands very similar to those of CHO cells. *Tetrahymena* gave only one band with molecular weight somewhat lower than 140 kD.

The results described above indicat the high similarity in the centromere / kinetochore protein components between HepII cells and the *Tetrahymena*. must have emerged earlier in life evolutionary history.

Key words *Tetrahymena*, Centromere protein, ACA serum